Qualitative und Quantitative Untersuchungen über anaerobe Myxobakterien

(Sphaerocytophaga)

---

von

Michael Winklmair

aus Coburg

1966

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535725_0007

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Aus dem Hygienisch - Bakteriologischen Institut
der Universität Erlangen - Nürnberg

Direktor: Professor Dr. M. Knorr

Qualitative und Quantitative Untersuchungen über anaerobe Myxobakterien (Sphaerocytophaga)

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich - Alexander - Universität

zu

Erlangen-Nürnberg

Vorgelegt von
Michael Winklmair
aus Coburg

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg.

Dekan: Prof. Dr. Dr. G. Steinhardt
1. Referent: Univ.-Doz. Dr. Dr. W. Gräf
2. Referent: Prof. Dr. M. Knorr
Tag der mündlichen Prüfung: 2.5.1966

Herrn Prof. Dr. M. Knorr schulde ich aufrichtigen Dank für die Überlassung des Themas. Ebenso meinen herzlichen Dank Herrn Universitätsdozent Dr. Dr. W. Gräf für die jederzeit gewährte großzügige Unterstützung und Förderung.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

II. Methodik

1.) Entnahmetechnik

2.) Entwicklung des optimalen Kultivierungsverfahrens

III. Ergebnisse

1.) Qualitative Befunde

a) Beurteilung der Kulturform

b) Unterschiedliche biochemische Eigenschaften

2.) Quantitative Befunde

IV. Zusammenfassung

I. Einleitung

Bei Untersuchungen über die Fusospirochätose der menschlichen Mundhöhle war Gräf 1961 auf Mikroorganismen gestoßen, die bisher als Bewohner der Mundhöhle unbekannt waren. Morphologisch hatten sie Ähnlichkeit mit gewissen Fusobakterien.

Bei näherer Untersuchung ergaben sich gramnegative fadenförmige Keime die zu aktiver Flexibilität befähigt waren. Als wesentliches Merkmal zeigten sie eine gleitend-kriechende Fortbewegung auf festen Unterlagen. Daneben war ihnen ein typischer Lebenszyklus eigen, der sich in der Ausbildung kugeliger Ruheformen (sogenannter Mikrozysten) unter bestimmten Lebensbedingungen manifestierte.

Aufgrund dieser Eigenschaften ließen sie sich der Ordnung der Myxobakterien (Myxobacteriales) zuordnen. Die bisher bekannten Myxobakterien sind in der freien Natur häufig vorkommende Arten, z.B. Sporocytophaga cauliformis (Knorr et Gräf), waren aber bisher bei Mensch und Warmblütler unbekannt. Abweichend von allen bisher bekannten Myxobakterien erwiesen sich die neuen Keime als strikte Anaerobier.

Diese Tatsachen veranlaßten Gräf für diese anaeroben Myxobakterien eine neue Gattung mit der Bezeichnung Sphaerocytophaga zu errichten.

Bei weiteren Untersuchungen dieser Gattung zeigte Gräf, daß diese Keime zu aktiver Zell- und Gewebszersetzung befähigt sind. Ihr zytopathogenes Verhalten erstreckt sich auch auf die Abwehrzellen des menschlichen Körpers. Sie sind in der Lage, Leukozyten zu töten und mechanisch zu zerstören.

Bei weiteren klinischen Untersuchungen war auch das pathogene Verhalten der neuen Keime nachweisbar. Sie konnten aus Zahnwurzelgranulomen gezüchtet werden, Gräf berichtet über den Fall einer Stomatitis ulcerosa bei der fast in Reinkultur Sphaerocytophaga filiformis zu finden war. Bakteriologische Untersuchungen von Parodontiden (Kudella) ergaben sowohl bei chronischen wie bei akuten Prozessen fast regelmäßig das Vorkommen von anaeroben Myxobakterien.

Obwohl die Kultivierung der anaeroben Myxobakterien mit dem Fortner-Verfahren durchführbar war, ließen sich bei der bisherigen Kultivierungstechnik Fehlschläge häufig nicht vermeiden, d.h. daß oft trotz eindeutigen Vorhandenseins der Keime im Untersuchungssekret das Anzüchten mißlang.

Vorausgehende klinische Untersuchungen über das Vorhandensein von Sphaerocytophaga bei akuten und chronischen Parodontopathien waren daher nur auf bakterioskopische Befunde zu stützen, was mit einer gewissen Sicherheit durch das typische Bewegungsverhalten der Keime möglich ist (Gräf und Kudella). Die so erhaltenen Befunde waren aber nur rein qualitativer Art, ohne dass das quantitative Vorkommen der Myxobakterien und ihr zahlenmäßiges Verhältnis zur übrigen Taschenflora erfaßt werden konnte.

So lag es auf der Hand, nach einer Methode zu suchen, bei der sich im Untersuchungsmaterial vorhandene Myxobakterien mit Sicherheit qualitativ und quantitativ darstellen und züchten lassen.

II. Methodik

1.) Entnahmetechnik

Bei der Entnahme des Untersuchungsmaterials mußte vor allem auf die besonderen Verhältnisse der Mundhöhle und des Parodontiums Rücksicht genommen werden. Diese sind einmal die zugänglichen Stellen der Zunge, des Zungengrundes, des Mundbodens und der Wangenschleimhaut, zum anderen die schwer erreichbaren Stellen der Interdentalräume und der mehr oder weniger tiefen Zahnfleischtaschen. Dabei ist vor allem darauf zu achten, daß das Material sicher vom Taschenboden und nur von dort entnommen wird. Aus quantitativen Gründen mußte außerdem für eine möglichst gleichgroße Menge Material bei der Entnahme gesorgt werden. Aufgrund dieser Überlegungen benützten wir eine in der Zahnheilkunde übliche Zylinderampulle mit einer vorne abgeschliffenen Kanüle. So war es möglich, auch in tiefe Zahnfleischtaschen bis zum Taschenboden vorzudringen und Material zu entnehmen, sozusagen "auszustanzen" (Abb. 1). Dazu wurden gebrauchte Zylinderampullen mit 0,5 ml Peptonwasser gefüllt und sterilisiert. Nachdem die Probe

Abb. 1: Die Abbildung zeigt die verwendete Zylinderampulle mit "Uniject"-Spritze und Zubehör.

vom Taschenboden aspiriert wurde, was mit der Uniject-Spritze möglich ist, wird der gesamte Ampulleninhalt in ein mit Ver-

dünnungsmedium gefülltes Kölbchen ausgespritzt, anschliessend verdünnt und auf Platten überimpft.

2.) Entwicklung des optimalen Kultivierungsverfahrens.

Da beim üblichen fraktionierten Ausstreichen des Untersuchungssekretes mit der Platinöse nach unseren Erfahrungen durch rasches und überschießendes Wachstum der Begleitflora die Myxobakterien häufig unterdrückt wurden, bestand unsere Aufgabe zunächst darin, geeignete Verdünnungsmedien zu suchen und ein optimales Homogenisierungsverfahren des Entnahmematerials auszuarbeiten.

a.) Verdünnungsmedien

Als Verdünnungsmedien wurden physiologische Kochsalzlösung, Thioglykolat, Peptonwasser (0,5 %) und Fleischwasserbouillon geprüft. In den genannten Medien wurden sowohl Reinkulturen von Myxobakterien als auch Myxobakterien enthaltendes Nativmaterial in einer Verdünnung von 1 : 100 suspendiert. Von den Suspensionen wurde dann jeweils 1 Tropfen auf 8 %ige Hammelblutagarplatten gegeben, ausgespatelt und anaerob bebrütet. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 1 und 2.

Verdünnungsmedien für anaerobe Myxobakterien

	Stamm 1	Stamm 2	Stamm 3	Stamm 4	Stamm 5
Na-Cl 0,85 %	++	++	+	+	+
Thioglykolat	+++	+++	+++	+++	++
Peptonwasser	++	++	+++	++	+++
Fleischwasser-B.	+++	++	++	++	++

+ = schlechtes Wachstum
++ = gutes Wachstum
+++ = sehr gutes Wachstum

Tabelle 1

Demnach war bei Verwendung von Reinkulturen mit Thioglykolat das optimalste Angehen der Myxobakterien zu beobachten. Gute Resultate erbrachten auch Peptonwasser und Fleischwasserbouillon als Verdünnungsmedien. Physiologische Kochsalzlösung dagegen schien auf die Keime einen ungünstigen Einfluß auszuüben (Tab. 1).

Die gleichen Suspensionsversuche mit Nativmaterial ergaben bei Thioglykolat und Peptonwasser gleichermaßen gute Resultate (Tab. 2), während Fleischwasserbouillon und NaCl-Lösung merklich abfielen.

	Fall 1	Fall 2	Fall 3	Fall 4	Fall 5
Na-Cl 0,85 %	27+2	16	22	160+1	3
Thioglykolat	36+8	159+7	56+1	270+3	13+2
Peptonwasser	161+2	203+8	77	177+4	19+2
Fleischwasser-B.	125+2	115+4	42	197+1	5+1

1. Zahl = Gesamtkeimzahl
2. Zahl = Myxobakterien

Tabelle 2

b.) Homogenisierung des Untersuchungsmaterials

Zur Erhaltung sicherer quantitativer Ergebnisse ist eine ausreichende Homogenisierung des Untersuchungsmaterials unerläßlich. Die nach den Untersuchungen von Knorr für diese Zwecke optimale Methode durch Verwendung hochtouriger Mixstäbe (Ultr Turrax) schien uns zunächst für unsere Versuche bedenklich, d

wir fürchteten, die Myxobakterien könnten wegen ihrer Hinfälligkeit (keine Zellwand) durch die hohe Tourenzahl Schaden leiden. Um diese Verhältnisse zu klären haben wir deshalb in Vorversuchen festgestellt, daß Verdünnungen von Myxobakterienreinkulturen bei der Homogenisierung mit dem Ultra-Turrax Mixstab bis zu einer Mixzeit von 5 Minuten Dauer bei der nachfolgenden Plattenaussaat keine merkbare Keimzahlverminderung zeigten, d.h. die Myxobakterienzellen offenbar diese mechanischen Belastungen ohne Schaden überstehen.

Zur Ermittlung des optimalsten Homogenisierungsverfahrens haben wir dann an 10 in Peptonwasser suspendierten (Verdünnung 10^{-2}) Untersuchungsmaterialien mit verschiedener Methodik die gleichmäßige Verteilung der in der Probe enthaltenen Keime vorgenommen. Dabei wurde die Probe zu gleichen Teilen einmal durch blosses Schütteln, zum andern durch 10-minütiges Rühren mittels Magnetrührstab und zuletzt durch 1-minütiges Mixen mit dem Mixstab homogenisiert und anschließend auf Blutplatten ausgespatelt.

Die anaerobe Kultivierung führte zu Ergebnissen die in Tabelle 3 niedergelegt sind.

Verschiedene Homogenisierungsverfahren

Fall:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Summe
Verd. 10^{-2} ungemixt	22 +2	37	31	54 +1	38 +1	24	30	49 +1	94 +1	3	382 6
Verd. 10^{-2} mit Magnetrührstab	68 +1	293 +12	96 +2	69 +3	300 +4	79 +1	52	301 +6	313 +13	24 +4	1595 46
Verd. 10^{-2} mit Ultra-Turraxstab	181 +2	268 +16	101 +1	125 +2	318 +11	87 +3	63	169 +2	358 +13	25 +3	1695 54

1. Zahl = Gesamtkeimzahl
2. Zahl = Myxobakterien

Tabelle 3

Demnach ist eine optimale Suspendierung der Keime und entsprechend die beste Myxobakterienausbeute sowohl mit dem Magnetrührer als auch durch hochtouriges Mixen möglich.

c.) Anaerobe Kultivierung

Da die Fortnerplatte zum Ausspateln von Verdünnungen wenig geeignet ist, wird versucht, eine Modifikation anzuwenden, die es gestattet die ganze Platte zu beimpfen. Als Nährboden verwendeten wir Fleischwasseragar mit 8 %igem Hammelblutzusatz. Die Blutplatten wurden mindestens 1 Stunde vorgetrocknet, um eventuelles Überschwärmen zu verhindern. Wir überimpften 1 Tropfen der homogenisierten 1:100- und 1:1000-Verdünnungen. Für die anaerobe Kultivierung wurde die Modifikation des Fortner-Verfahrens nach Schoop verwendet, d. h. eine durchbohrte Glasplatte über die beimpfte Blutplatte gelegt und von der anderen Seite eine Fleischwasseragarplatte die mit Serratia marcescens beimpft war daraufgedeckt. Das ganze wurde beiderseits mit Plastelin luftdicht abgeschlossen und bei 37° C bebrütet. Es ist zu empfehlen, die Serratia-Platte bereits 1 Stunde vor dem Verschließen zu beimpfen und zu bebrüten.

d.) Endgültige Methodik

Aufgrund der verschiedenen Versuchsergebnisse haben wir die Züchtung und Isolierung der Myxobakterien wie folgt durchgeführt: Punktförmige Entnahme des Materials mit einer stumpfen Kanüle aus der Tasche oder einer anderen Stelle der Mundhöhle. Verdünnung der Probe mit 0,5 %igem Peptonwasser und Homogenisierung des Materials mit dem Magnetrührer 10 Minuten oder mit dem Turraxstab 60 Sekunden. Danach wird 1 Tropfen der Verdünnung auf 8 %igen Hammelblutagar ausgespatelt. Die anaerobe Bebrütung wird mit einer Modifikation des Fortner-Verfahrens nach Schoop durchgeführt. Nach 4 Tagen wird die Platte geöff-

net und auf für Myxobakterien typische Kolonien untersucht. Bei verdächtigen Kolonien erfolgt die erste Differenzierung durch Beweglichkeitsprüfung im sog. Falschen hängenden Tropfen (Gräf).

III. Ergebnisse

Um Einblick in das zahlenmäßige Vorkommen der anaeroben Myxobakterien in der Mundhöhle zu gewinnen, haben wir in einer Versuchsreihe mit der von uns erarbeiteten Methodik den Myxobakterienanteil der Taschenflora bei 20 weitgehend reizlosen Zahnfleischtaschen von unterschiedlicher Tiefe ermittelt.

Die dabei gewonnenen Erkenntnisse sollen im folgenden unter qualitativen und quantitativen Gesichtspunkten dargelegt werden.

1.) Qualitative Befunde

Im Verlauf der durchgeführten Kultivierungsverfahren haben sich bezüglich Kolonieform Physiologie und Morphologie der gefundenen Myxobakterienstämme eine Reihe von bisher unbekannten Tatsachen ergeben, die eine ins einzelne gehende Beschreibung notwendig machen, da sie für künftige Myxobakterienuntersuchungen im Bereich der menschlichen Mundhöhle von wesentlicher Bedeutung sind.

a.) Beurteilung der Kulturform

Die mit den Sekretverdünnungen angelegten anaeroben Platten werden nach einer Bebrütungszeit von 3 - 4 Tagen geöffnet und dann die gewachsenen Oberflächenkolonien auf "Myxobakterienverdacht" hinsichtlich Form, Farbe und Dichte untersucht.

Dabei stellte sich heraus, daß wiederum die bereits bekannten Kolonieformen auftraten, die grundsätzlich für alle Myxobakterien als charakteristisch zu gelten haben (Gräf): Es entwickeln sich zunächst kleine hauchförmige Scheibchen, die im weiteren Wachstumsverlauf sich zu flachen, durchsichtigen, höckerigen Kolonien gestalten, die von einem mehr oder minder breiten monozytärem Schwärmsaum umgeben sind (Abb. 2).

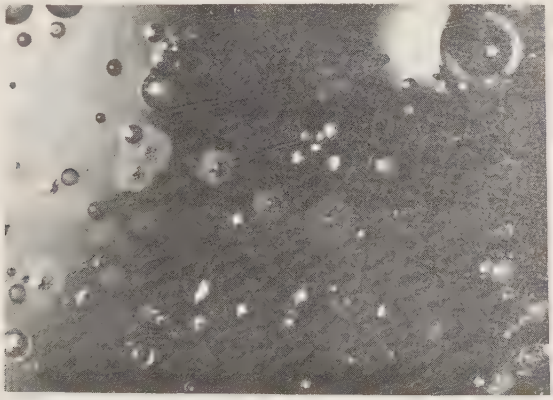

Abb. 2: Die Abbildung zeigt die Oberfläche einer mit Sekretverdünnung beimpften Blutplatte, nach 4 Tagen anaeroben Bebrütens. Deutlich sind die charakteristisch flachen, höckerigen Myxobakterienkolonien mit Schwärmsaum zu erkennen.

Daneben konnte aber festgestellt werden, daß auch davon abweichende Kolonien aus Myxobakterien bestehen, die rund, mit peripherer Wallbildung und unregelmäßigem Rand gestaltet waren. Ein Schwärmsaum war bei diesem Kolonietyp nicht vorhanden(Abb.3).

Abgesehen von der unterschiedlichen Kolonieform waren Farbe und Konsistenz beider Kolonietypen einheitlich: Bei Betrachtung im spiegelnden bzw. schräg auffallendem Licht besitzen sie ein

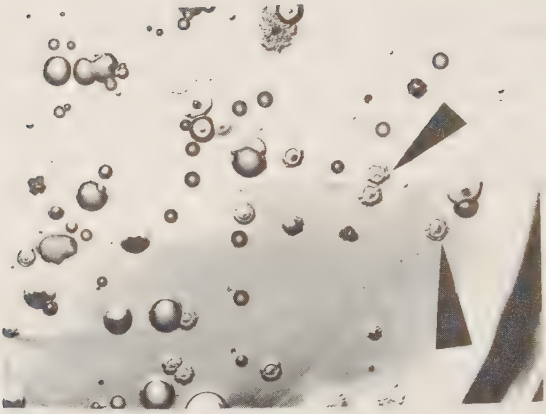

Abb. 3: Die Abbildung zeigt die mit Sekretverdünnung beimpfte Blutplattenoberfläche nach 4 Tagen anaeroben Bebrütens. Mit Pfeilen versehen sind diejenigen Kolonien die abweichend von den bisherigen Myxobakterien ohne Schwärmsaum wachsen.

blaulila, milchiges Aussehen und entfalten im spiegelnden Licht ein typisches Irisieren, das besonders bei Tageslichtbeobachtung deutlich wird. Bei Durchlichtbetrachtung erweisen sich die Kolonien sehr kontrastarm. Eine Veränderung des bluthaltigen Nährbodens im Sinne einer Hämolysezone oder Vergrünung war niemals zu beobachten. Hinsichtlich der Größenausdehnung wiesen die Kolonien mit Schwärmsaum ein Durchmesser von etwa 3 - 4 mm auf, während die nicht schwärmenden Typen etwa Stecknadelkopfgröße erreichten.

Daraus ergibt sich die wichtige Folgerung, daß man bei der Kultivierung anaerober Myxobakterien nicht ausschließlich nur schwärmende Kolonien untersuchen sollte, sondern auch der be-

schriebenen zweiten Kolonietyp Beachtung schenken muß, was unter Berücksichtigung der übrigen gemeinsamen Charakteristiken möglich ist.

Demnach sind alle Kolonien als "Myxobakterien verdächtig" anzusehen, die mit oder ohne Schwärmsaum im schräg auffallenden Licht ein blaulila Aussehen zeigen und bei Durchlichtbeobachtung praktisch ohne Kontrast sind. Die endgültige Klärung bleibt dann natürlich einer Phasenkontrastbeobachtung im falschen hängenden Tropfen vorbehalten, wobei neben der Morphologie vor allem das kriechend-gleitende Bewegungsverhalten den Ausschlag gibt.

b.) Unterschiedliche biochemische Eigenschaften

Nach unseren bisherigen Kenntnissen über die Myxobakterien der Gattung Sphaerocytophaga schienen diese Bakterien alle einheitlich außerordentlich schwache Fermentaktivitäten zu besitzen (Gräf). Dies trifft aber offenkundig nicht zu für die Subkulturen, die sich aus den bereits beschriebenen nicht schwärmenden Kolonietypen isolieren lassen(Abb. 4).

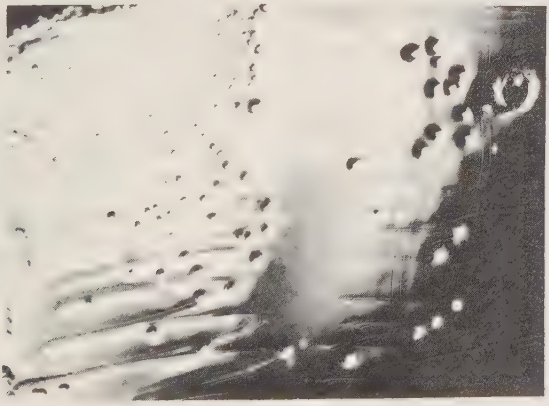

Abb. 4: Die Abbildung zeigt die Subkultur einer Myxobakterienkolonie ohne Schwärmsaum, die in den Agar einsinkt.

Bei Subkulturen der Stämme ohne Schwärmsaum die besonders vom Boden tiefer Zahnfleischtaschen stammten, konnten wir eine ungewöhnliche Form des Kolonienwachstums beobachten: Schon in den ersten Tagen der anaeroben Kultivierung schienen die Kolonien in den Agar einzusinken. So entstanden nach mehrtägiger Bebrütung größere muldenartige Vertiefungen (Abb. 4). Bei Verimpfung dieser Stämme auf Leber-Leber-Röhrchen wuchsen sie besonders im unteren Teil des Röhrchens. Auch nach einigen Passagen in Leber-Leber-Bouillon hatten diese Stämme die Fähigkeit, den Agar hineinzuwachsen nicht eingebüßt.

Dieses eigenartige Kulturverhalten der Stämme läßt die Frage entstehen ob es sich hierbei nicht um eine Agarzersetzung bzw. -verflüssigung handelt.

Bereits 1941 hatte Stanier über zwei agarzersetzende Myxobakterienarten berichtet, die er als Cytophaga Krzemieniewskae und Cytophaga diffluens bezeichnet. Humm, der die südliche Atlantikküste der Vereinigten Staaten nach agarzersetzenden Bakterien untersuchte fand unter 20 solcher Arten ein Myxobakterium, das er Cytophaga sensitiva nannte. Diese 3 agarzersetzenden Cytophaga-Arten wiesen alle aerobes Wachstum auf. Als erste isolierte B. Bachmann 1955 ein neues Myxobakterium aus Meerschlamm das als erstes unter den bisher bekannten Arten die Fähigkeit besaß unter anaeroben Bedingungen zu wachsen. Aufgrund der fermentativen Eigenschaften bezeichnete sie das Myxobakterium als Cytophaga fermentans. Später berichtete auch Veldkamp (1961) über zwei fakultativ anaerobe Myxobakterien die agarzersetzende Eigenschaften aufwiesen. Er nannte sie Cytophaga fermentans Bachmann var. agarovorans and C. salmonicolor var. agarovorans.

Es scheint unter den angegebenen Umständen nicht abwegig, auch in unserem Falle eine echte Agarzersetzung anzunehmen. Da wir dann allerdings für diese agarzersetzenden, anaeroben Myxobak-

terien der menschlichen Mundhöhle innerhalb der Gattung Sphaerocytophaga eine neue Spezies begründen müßten, haben wir uns vorgenommen die Verhältnisse noch eingehender zu studieren und einer Klärung zuzuführen.

Im Folgenden sollen zunächst die morphologischen und biochemischen Eigenschaften dieser besonderen Stämme untersucht werden.

A. Kulturelle Eigenschaften

Die Stämme werden alle nach der oben angegebenen Methodik gezüchtet und isoliert. Die zwei von uns gefundenen Stämme unterscheiden sich in der Kolonieform. Der eine Stamm zeigt ein spitzes Zentrum (Abb. 5), der andere nur schalenförmiges Einsinken. Die Keime wachsen tief in den Agar ein und die Kolonien sinken bis zu 1 mm in den Agar ein. Die Einzelkolonien haben einen Durchmesser bis zu 3 mm. Die Stichkulturen zeigen ein wesentlich anderes Wachstum als die bisher bekannten Stämme (Abb. 6). Im Leber-Leber-Röhrchen wachsen sie fast nur im unteren Drittel, ein Zeichen ihrer strikten Anaerobinose.

Abb. 5: Die Abbildung zeigt die unterschiedliche Kulturform der in den Agar einsinkenden Stämme, links mit spitzem Zentrum, rechts nur schalenförmiges Einsinken.

Abb. 6: Auf der Aufnahme sind Stichkulturen von Fleischwasseragar mit 10%igem Serumzusatz abgebildet, links eine Kultur der agarzersetzenden Myxobakterien, rechts eine der bisher bekannten Stämme.

B. Morphologie

Morphologisch zeigen die beiden isolierten Stämme dasselbe Bild wie die bereits bekannten anaeroben Myxobakterien (Abb. 7). Die Färbung zeigt, daß sich die Keime gramnegativ verhalten. Die Gestalt der Keime ist fusiform mit abgerundeten Enden. Die Keime sind im ganzen etwas kürzer und kleiner als die bisherigen Sphaerocytophaga-Stämme. Sie zeigen gutes Bewegungsverhalten.

Der Lebenszyklus dieser Keime stimmt im wesentlichen völlig mit dem von Sphaerocytophaga Gräf überein. Es sind in 6 - 8 Tage alten Kulturen Sphaeroide nachweisbar (Abb. 7), die die gleichen Eigenschaften wie die von Gräf beschriebenen aufweisen.

Abb. 7: Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt Myxobakterien der neu isolierten Stämme aus 6 - 8 Tage alten Kulturen.

C. Biochemische Eigenschaften

a. Das Kohlehydratspaltungsvermögen wurde als erstes geprüft, und zwar in der Weise wie es Gräf beschrieb. Die Bebrütung erfolgte im Anaerobentopf nach Knorr, der mit Stickstoff aufgefüllt war. Es wurden geprüft Dextrose, Lactose, Saccharose, Maltose, Mannit und Inulin. Es ergab sich folgendes Resultat: Gasbildung war bei allen Stämmen nicht sicher nachzuweisen. Die Säuerungsfähigkeit ist aus Tabelle 4 zu entnehmen. Der maximale Säuerungswert lag bei ca. pH 5.

Daraus ergibt sich im Vergleich zu den bisher bekannten Sphaerocytophagaarten im Zuckervergärungsvermögen ein deutlicher Unterschied.

b. Indolbildung: Es wurden Röhrchen mit 3 ml Trypsinbouillon und 0,2 ml Rinderserumzusatz verwendet. Nach 7-tägiger Bebrütung wurde mit dem Ehrlichschen Indolreagens auf Indolgehalt geprüft. Bei beiden Stämmen war das Indolbildungsvermögen nicht sicher nachweisbar.

	Dextrose	Lactose	Saccharose	Maltose	Mannit	Inulin
Leerwert	6,92	6,99	6,93	6,95	7,00	7,01
Normal-Stamm Ni 3	6,30	6,45	6,01	6,19	6,82	6,65
Stamm [illegible]	5,24	5,49	5,69	5,58	6,07	5,34
Stamm O	5,02	5,40	5,22	5,51	5,84	4,99

Tabelle 4

c. Gelatinespaltung: Die Stämme wurden in Gelatinröhrchen (5ml Gelatine + 0,3 ml Rinderserum) geimpft und bei 37° C im Anaerobentopf 7 Tage lang bebrütet. Das Ergebnis war eine völlige Gelatineverflüssigung. Somit besteht auch hierin ein wesentlicher Unterschied zu den bisher bekannten Sphaerocytophagaarten.

d. H_2S-Bildung: Dazu wurde Bleiazetatagar mit 0,3 ml Serumzusatz in Röhrchen (5ml) gegossen und nach dem Erstarren mit den einzelnen Stämmen im hohen Stich beimpft. Die Bebrütung erfolgte wieder bei 37° C im Anaerobentopf für die Dauer von 4 Tagen. Das Ergebnis war negativ.

Abschließend ist zu den Stoffwechseleigenschaften der neuen Keime zu bemerken, daß sie eine höhere Fermentleistung als die bisher bekannten Sphaerocytophaga-Arten zeigen, was das Gelatinespaltungsvermögen und die Zuckervergärung bis zu pH 5 beweisen, wie ja auch aus der Fähigkeit in den Agar einzusinken, nicht anders zu erwarten war.

D. Pathogenität

Da unsere Keime aus tiefen Zahnfleischtaschen stammen und auch wie die Ergebnisse zeigten, veränderte Fermenteigenschaften aufweisen, lag der Gedanke nahe, das pathogene Vermögen dieser

Keime zu untersuchen. Bereits Gräf hatte Untersuchungen an der Bauchhaut von Meerschweinchen und am Auge von Kaninchen angestellt. Kudella konnte bei Direktverimpfung von Reinkulturen zwischen die beiden unteren Incissivi eine Gingivitis von längerer Dauer unterhalten.

Wir gingen bei unseren Versuchen folgendermaßen vor. Reinkulturen unserer Stämme wurden Meerschweinchen intrakutan in die gut rasierte Bauchhaut gespritzt, anschließend die Einstichstelle ausgiebig mit Jod bestrichen. In der Mundhöhle wurde bei den Meerschweinchen zwischen die beiden unteren Schneidezähne tief eingestochen und o,2 ml flüssige Reinkultur eingespritzt.

Es ergab sich bei den in die Bauchhaut gespritzten Versuchstieren über der intrakutanen Quaddel eine Infiltration, die bereits nach 1 Tag auftrat. Nach 7 Tagen ging diese Infiltration in eine starke Verschorfung über, bei der sich die Epidermis in ihrer Gesamtheit ablöste. Bei der Injektionsstelle in die Gingiva fand man bei allen Versuchstieren nach 3 Tagen eine Rötung der Gingiva die bis zum Ende des Versuchs, ca. eine Woche lang, anhielt.

Aus diesen Versuchen wird die Affinität der Myxobakterien zum Epithel deutlich, was besonders der Versuch an der Bauchhaut der Meerschweinchen zeigt, wobei eine Pathogenität, die stärker ist als die der bisher bekannten Stämme, auffällt.

2.) Quantitative Befunde

Nachdem uns nunmehr eine Methodik zur sicheren Anzüchtung der anaeroben Myxobakterien aus Zahnfleischtaschensekreten zur Verfügung stand, war es möglich in das zahlenmäßige Vorkommen dieser Keime in der menschlichen Mundhöhle Einblick zu gewinnen.

Wie schon berichtet, wurde in 20 Fällen aus weitgehend reizlosen Zahnfleischtaschen mit unserer Entnahmetechnik Sekret gewonnen

und entsprechend verarbeitet. Bei der zahlenmäßigen Auswertung der Befunde wurden neben den Myxobakterien auch die Gesamtkeimzahl erfaßt. Diese Werte finden sich in Tabelle 5 zusammengefaßt

	Verdünnung	Gesamtkeimzahl	Myxobakterien	%
1	1:100	812	42	5,0
2	1:1000	322	10	3,0
3	1:1000	54	1	1,8
4	1:1000	360	12	3,3
5	1:100	560	17	3,0
6	1:100	1480	24	1,8
7	1:100	221	6	2,8
8	1:100	1760	53	3
9	1:100	90	3	3,3
10	1:100	230	8	3,4
11	1:100	321	10	3,0
12	1:100	297	12	4,0
13	1:100	318	11	3,5
14	1:100	69	3	4,2
15	1:100	406	15	3,7
16	1:100	289	5	1,8
17	1:1000	46	4	8,7
18	1:1000	248	16	6,4
19	1:1000	72	2	2,8
20	1:1000	314	14	3,6
		8269	266	3,2

Tabelle 5

Als wesentliches Ergebnis läßt sich feststellen, daß anaerobe Myxobakterien als regelmäßige Bestandteile der Taschenflora anzusehen sind. Ihr Anteil an der Gesamtkeimzahl wies bei unseren Untersuchungen eine Schwankung von 1,8 % bis 8,7 % auf. Im Mittel betrug der Anteil von Sphaerocytophaga an der Gesamtkeimzahl 3,2 %.

Mit diesen Zahlenangaben haben wir eine bis jetzt vorherrschende wesentliche Lücke unserer Kenntnisse über das Vorkommen anaerober Myxobakterien (Sphaerocytophaga) geschlossen.

IV. Zusammenfassung

Es wurde eine Methodik zur Züchtung und Isolierung anaerober Myxobakterien, Sphaerocytophaga Gräf, ausgearbeitet. Die geeigneten Verdünnungs- und Homogenisierungsverfahren der Untersuchungssekrete wurden untersucht.

Dabei konnte festgestellt werden, daß anaerobe Myxobakterien in zwei verschiedenen Kolonietypen auftreten.

Ferner konnten neue Sphaerocytophaga-Stämme mit abweichenden, biochemischen Eigenschaften isoliert werden, die sich besonders durch starke Zuckervergärung, Gelatineverflüssigung und vor allem durch Agarzersetzung auszeichnen.

Bei quantitativen Untersuchungen an 20 Zahnfleischtaschensekreten ergab sich, daß der mittlere Anteil von Sphaerocytophaga an der Taschenflora 3,2 % beträgt.

Schrifttum

BACHMANN, B. J.: J. gen. Microbiol. 13 (1955) 441

GRÄF, W.: Arch. Hyg. 145 (1961) 405

GRÄF, W.: Arch. Hyg. 146 (1962) 115

GRÄF, W.: Arch. Hyg. 146 (1962) 481

GRÄF, W.: Arch. Hyg. 146 (1962) 492

GRÄF, W.u.KUDELLA F.: DDZ im Druck

HUMM, H.J.: Bull.Duke Univ.Mar.Sta. 3 (1946) 45

KUDELLA, F.: Med. Diss. 1966

STANIER, R.Y.: J. Bact. 42 (1941) 527

STANIER, R.Y.: Bact. Rev. 6 (1942) 124

VELDKAMP, H.: J. gen.Microbiol. 26 (1961) 331

Lebenslauf

Am 27.3.1938 wurde ich, Michael Winklmair in Coburg geboren. Dort besuchte ich die Volksschule bis 1946, dann zog ich nach Erlangen um und wurde 1948 Schüler des Gymnasiums Friedericianum. 1953 eröffnete mein Vater Priv.-Doz. O. P. Winklmair seine Zahnarztpraxis in Coburg. Seitdem besuchte ich das Gymnasium Casimirianum, wo ich am 17.8.1958 das Zeugnis der Reife erhielt.

Von 1958 bis 59 leistete ich meinen Grundwehrdienst bei den Gebirgsjägern und schlug dabei die Laufbahn eines Reserveoffiziers ein.

Im Wintersemester 1959/60 begann ich das Studium der Medizin und Zahnheilkunde an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen. Am 3. März 1962 bestand ich die ärztliche Vorprüfung und am 1. August 1962 die zahnärztliche Vorprüfung. Anschließend setzte ich mein Studium an den Universitäten Innsbruck und Berlin fort. Die letzten klinischen Semester kehrte ich nach Erlangen zurück und schloß meine beiden Studien mit der ärztlichen Prüfung am 10. August 1965 und der zahnärztlichen Prüfung am 16.12.1965 ab. Am 20.12.1965 wurde ich zum Dr. med. promoviert.

Offset+Fotodruck
- W. Hogl, Erlangen, Brüxer Straße 9, (Nähe Röthelheimbad) Telefon 15336 -

Offset - Fotodruck
- W. Hogl, Erlangen, Brüxer Straße 9, (Nähe Röthelheimbad) Telefon 15336 -